



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(19)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

EP 0 875 271 A2

(11)



CK

(43) Veröffentlichungstag: 04.11.1998 Patentblatt 1998/45
(51) Int. Cl. B01D 39/00, C12M 1/12, C12N 1/08, C12N 15/10

(21) Anmeldenummer: 98107576.5

(22) Anmeldetag: 01.12.1992

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE DK FR GB IT LI LU NL SE

(30) Priorität: 02.12.1991 DE 4139664

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)
nach Art. 76 EPU:
92924637.9 / 0 616 639

(71) Anmelder: **ALGEN GmbH**
40724 Hilden (DE)

(72) Erfinder: **Colpan, Melin, Dr.**
45219 Essen (DE)

(74) Vertreter:
Meyers, Hans-Wilhelm, Dr. Dipl.-Chem. et al
Patentanwälte
von Kreisler-Selling-Werner
Postfach 10 22 41
50462 Köln (DE)
Bemerkungen:
Diese Anmeldung ist am 25. 04. 1998 als
Teilanmeldung zu der unter INID-Kode 62
erwähnten Anmeldung eingereicht worden.

(54) Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

(57) Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei die Nukleinsäuren enthaltenen Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt werden durch Filtration an einer Filterschicht.

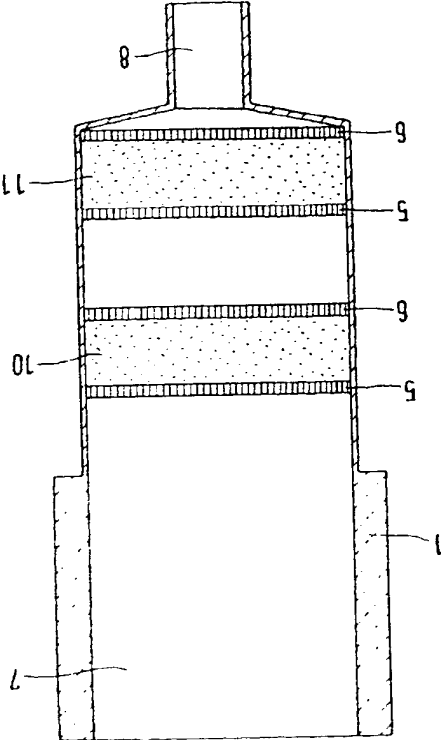


FIG. 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren wie Plasmid- oder genomischer DNA aus Zellen oder anderen Quellen und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß Oberbegriff des Patentanspruchs 16.

Bei der Präparation von Nukleinsäuren müssen die Zellen zunächst durch die Verwendung von Enzymen, wie zum Beispiel Proteinase K, Lysozym und Detergen-ten wie SDS, Brij, Triton-X-100, Tween 20, DOC und Chemikalien wie Natriumhydroxid, Guanidin-Hydrochlorid und Guanidin-Isocyanat aufgeschlüsselt werden. Dem Experimentator stellt sich das Problem, vor der Reinigung der Nukleinsäuren die Zelltrümmer zu entfernen und dann aus dem Zell-Lysat die Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefraktionen zu isolieren. Weiterhin müssen bei der Präparation von Plasmid DNA oder genomischer DNA häufig verwendete Detergentien, wie SDS (Sodium Dodecylsulfat), entfernt werden. Dies erfolgt wie in den meisten Fällen bei Verwendung von SDS durch ein Ausfällen mit Kaliumacetat, da das Kaliumsalz von SDS schwer löslich ist. Die Zelltrümmer werden dann zusammen mit dem ausgefallenen SDS abzentrifugiert. Da die Bestandteile im Lysat ein sehr voluminöses und schwieriges, gelartiges Pellet ergeben, bereitet selbst die Abtrennung dieser Trümmer in einer hochtourigen Zentrifuge Schwierigkeiten. Üblicherweise erfolgt die Entfernung der Zelltrümmer durch eine Zentrifugation zwischen 5 000 g bis 20 000 g für 15 bis 60 Minuten. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß es sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist und sich nicht automatisieren läßt.

Die DE-A 36 39 949 beschreibt ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung langkettiger Nukleinsäuren von anderen Substanzen aus Bakterien, Viren, tierischen und pflanzlichen Geweben und Zellen sowie Körperflüssigkeiten, insbesondere Zellinhaltsstoffen und/oder deren Abbauprodukten sowie Bestandteilen der Zellschäle. Dabei werden die langkettigen Nukleinsäuren nach einem schonenden Aufschluß und Entfernung der Zellbruchstücke und anderer ungelöster Bestandteile an einem Anionenaustauscher fixiert, während die abzutrennenden Substanzen ausgewaschen werden. Danach werden die fixierten Nukleinsäuren mit einem Puffer hoher Ionenstärke von der Matrix wieder abgelöst. Aus der DE-A 37 17 211 ist ein Verfahren bekannt zur Trennung und Reinigung von Biopolymeren, wie Nukleinsäuren, wobei die Nukleinsäuren an einer in einer speziellen Vorrichtung angeordneten Matrix adsorbiert werden. Die Pufferbedingungen sind dabei so eingestellt, daß die Nukleinsäuren überwiegend adsorbiert werden, während störende Substanzen, wie Proteine, niedermolekulare Stoffe oder auch Zelltrümmer, nicht gebunden werden.

In "Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren, eine Einführung und methodische

Anleitung", herausgegeben von Ulrich Wobst, Verlag Chemie, 1980 werden Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren, beschrieben. Daraus geht hervor, daß hochmolekulare Ribonukleinsäuren in Salzlösungen > 1,5 M Natriumchlorid unlöslich sind und ausfallen. Diese Präzipitation wird jedoch als nicht effizient angesehen, so daß in dieser Monographie bereits mehrere Verfahren zur Fraktionierung der Präzipitationsschritte mit hoher Salzkonzentration empfohlen werden.

Eine effiziente Trennung sowohl von DNA-Restriktionsfragmenten und amplifizierten Produkten der Polymerase-Kettenreaktion wird in J. Chromatogr., 1990, 512, 433 - 444 beschrieben. Als Chromatographiematerial wird ein Ionenaustauscher DEAD-NPR-Material mit 2,5 µm großen, nicht porösen Partikeln verwendet. Nukleinsäure aus Heften wurden gemäß Biochemistry 1972, 4848 an Poly(L-Lysine)-beschichtetem Kieselgeln getrennt. Ebenso wurde bereits mitochondriale DNA an solchen chromatographischen Materialien getrennt.

In Chromatographia, 1984, 19, 236 - 9 wird die Verwendung von mehrdimensionaler Chromatographie zur Isolierung von synthetischen Oligodeoxyribonukleotiden im präparativen Maßstab beschrieben. In einem ersten Schritt wird dabei zunächst eine Size-Exclusion-Chromatographie an Sephadex G-15 durchgeführt, gefolgt von einer Size-Exclusion-Chromatographie mit einer HPLC-Ionenaustauschersäule (Partisil-10 SAX). Daran schließt sich eine hydrophobe Chromatographie mittels HPLC (Nucleosil C18) an.

Über die Eignung von hydrophob beschichteten Glaspartikeln zur Durchführung von adsorptionschromatographischer Reinigung von Nukleinsäuren wird in J. Biochem., 94, 163 - 169 (1983) berichtet. Nachteilig an diesem stehvertretenden Stand der Technik ist die Tatsache, daß ein Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Zellbruchstücke und der ungelösten Bestandteile aus dem Zell-Lysat notwendig ist. Ein weiteres Problem besteht darin, daß die Nukleinsäuren durch die Elution in Puffern hoher Ionenstärke von den in großer Konzentration vorhandenen Salzen befreit und gleichzeitig konzentriert werden müssen. In den allermeisten Fällen sind die weiteren Verfahrensschritte mit den so gewonnenen Nukleinsäuren nur mit Pufferbedingungen möglich, die geringere Ionenstärken aufweisen. Die Entfernung der in hoher Konzentration im Puffer gelösten Salze kann auch durch Dialyse erfolgen, jedoch führt dies zu merklicher Degradation der Nukleinsäuren in den entsprechenden Puffern. Nach der Dialyse muß die entsalzte Nukleinsäure durch eine Gefrierockung konzentriert werden. Eine andere Art der Konzentrierung erfolgt durch eine Fällung der Nukleinsäure mit Ethanol, Isopropanol, Polyethylenglykol (PEG). Die Nukleinsäuren sind in diesem System nicht löslich und fallen aus. Die ausgefallenen Nukleinsäuren müssen jedoch durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert werden. Das Nukleinsäurepellet wird kurz getrock-

net und anschließend in einem kleinen Volumepuffer

sehr niedriger Salzkonzentrationen gelöst, um eine konzentrierte salzreiche Nukleinsäureprobe zu erhalten. Durch diese Zentrifugations- und Fällungsverfahren ist eine einfache und schnelle Gewinnung von Nukleinsäuren nicht möglich und eine Automatisierung läßt sich nur schwer durchführen. Andererseits steigt der Bedarf nach einfachen und automatisierten Verfahren zur Präparation von Nukleinsäuren durch das Vordringen der Molekularbiologie in die klinische Diagnostik sowie die Sequenzierung des menschlichen Genoms. Dabei sind jeweils große Probenmengen aufzubereiten.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das es ermöglicht, Nukleinsäuren zu isolieren und zu reinigen, ohne daß ein Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Zellbruchstücke oder ungelöster Bestandteile des Zell-Lysats notwendig wäre und, ohne daß die Nukleinsäuren in Pufferlösungen hoher Salzkonzentration anfallen, wobei die Nukleinsäuren einen nachgeschalteten Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt benötigen. Das bereitzustellende Verfahren soll die Nukleinsäuren praktisch in einem direkt weiterverarbeitbaren Zustand liefern. Ein weiterer Aspekt des genannten technischen Problems besteht in der Schaffung einer Vorrichtung, mit der das Verfahren in besonderer vorteilhafter Weise ausgeführt werden kann.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird in überraschend einfacher Weise durch ein Verfahren gelöst, daß durch die Merkmale des Anspruchs 1, 34, 36 charakterisiert ist. Die daran anschließenden Verfahrensansprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Eine Vorrichtung, mit der das erfindungsgemäße Verfahren in besonders vorteilhafter Weise ausgeführt werden kann, ist durch die Merkmale des Anspruchs 16, 35, 37 charakterisiert. Die darauf zurückbezogenen Unteransprüche betreffen weitere bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Zunächst werden die Zellen, deren Nukleinsäure isoliert werden sollen, in üblicher Weise aufgeschlossen und die Zelltrümmer werden entfernt. Dies kann mittels Filtration oder Zentrifugation geschehen. Vorzugsweise erfolgt die Gewinnung der klaren Zell-Lysate durch eine Filtration über eine stufenweise oder asymmetrisch aufgebaute Filterschicht. Das die Nukleinsäuren enthaltende Filtrat kann sofort mit Anionenaustauschern behandelt werden. Als Anionenaustauscher kann ein handelsübliches Material ausgewählt werden, welches eine Bindung der zu isolierenden Nukleinsäure unter den jeweiligen Präparationsbedingungen erlaubt. Die Anionenaustauscher sind vorzugsweise oberflächenmodifizierte Träger aus einer Matrix, vorzugsweise bestehend aus Agarose, Dextran, Zellulose, Acrylamid, Polyvinylalkohol, Polystyrol, Glas, Aluminiumoxid, Titan dioxid, Zirkoniumdioxid oder Silicagel, wie zum Beispiel DEAE-Sephharose, Q-Sephharose, DEAE-Sephadex, DEAE-Cellulose, Amberlite Nukleogen, Diagen, Die Anionenaustauscher befinden sich das Material zur Bindung der Nukleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke in einem separaten überwiegend zylindrischen Hohlkörper. Die von dem Ionen austauschermaterial beschriebene Nukleinsäure wird in der hoch-

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

ionenaustauscher können poröse Trägermaterialien mit einer zur Wechsellwirkung geeigneten inneren Oberfläche hoher Kapazität oder nicht poröse Trägermaterialien sein, die nur auf der äußeren Oberfläche eine Wechsellwirkung mit dem zu trennenden Gemisch eingehen. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Anionenaustauscher um ein Material auf Basis von Silicagel, das eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, vorzugsweise 10 bis 50 µm und ganz besonders bevorzugt 15 bis 25 µm und einen Porendurchmesser von 1 bis 2.500 nm, bevorzugt 10 bis 500 nm, besonders bevorzugt 100 bis 400 nm, aufweist. Als Anionenaustauschermaterial hat sich insbesondere ein Material mit hoher Oberfläche und hoher Bindungskapazität für Nukleinsäuren erwiesen. Die Modifizierung des Silicagel erfolgt vorzugsweise durch Silanisierung des Trägermaterials, wie beispielsweise in der EP-A 83 901 065, DE-A-39 35 098 und US-A-5,057,426 offenbart. In der EP-A 83 901 065 wird zum Beispiel gamma-Glycidioxypropyltrimethoxysilan und N,N-Dimethylaminooctanold zur Modifizierung des Trägermaterials verwendet.

Die Adsorption der Nukleinsäuren erfolgt unter Bedingungen, wie sie typischerweise bei niedrigen Salzkonzentrationen vorliegen. Vorzugsweise sind die Nukleinsäuren von der Säule eluiert werden können. Je nach verwendeten Ionen austauschermaterialien und pH-Werten kann die Salzkonzentration dabei 0,25 bis 1,5 M betragen.

Nach der Adsorption der Nukleinsäuren an dem Anionenaustauschermaterial kann sich mindestens ein Waschschritt mit Puffer geringer Ionenstärke anschließen. Vorzugsweise befindet sich das Ionen austauschermaterial dabei in einem überwiegend zylindrischen Hohlkörper einer Säule. Die Säule wird dann mit einer Salzlösung gewaschen, deren Ionenstärke so hoch wie möglich ist, ohne daß die erwünschte Nukleinsäure eluiert wird. Damit werden niedermolekulare und schwach geladene Verunreinigungen und Proteine aus-

gewaschen.

Um unnötige Ausbeuteverluste zu vermeiden, kann es vorteilhaft sein, zwischen dem Adsorptionsschritt und dem Elutionsschritt oder als letzten Waschschritt eine Konditionierung der betreffenden Adsorptionmaterialien durchzuführen, indem eine -möglichst hohe Ionenstärke insbesondere in dem Bereich, in dem die spätere Adsorption der Nukleinsäure unter Hochsalzbedingungen erfolgen soll, eingesetzt wird. Dazu kann insbesondere eine Lösung zur Aquilibrierung und Konditionierung verwendet werden, die einer Ionenstärke von etwa 1,5 M Natriumpersulfat bei einem pH von ungefähr 5 entspricht.

Entsprechend befindet sich das Material zur Bindung der Nukleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke in einem separaten überwiegend zylindrischen Hohlkörper. Die von dem Ionen austauschermaterial beschriebene Nukleinsäure wird in der hoch-

[illegible]

Zugabe von niederen Alkoholen in die Probe erfolgen. In Frage kommen vorzugsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol sowie Butanol. Die bevorzugten Mengenbereiche, in denen die Alkohole der Probe zugesetzt werden, betragen 1 - 50% (v/v), soweit sie überhaupt in diesen Bereichen in Wasser löslich sind. Des weiteren kann die Adsorption der Nukleinsäuren auch durch Polyethylenkole erreicht werden. Die verwendeten Ethylenkole weisen Molekulargewichte von 1.000 bis 100.000, insbesondere 6.000 bis 8.000, auf. Polyethylenkole kann in Bereichen von 1 - 30% der Probe zugesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt übertra-
schenderweise, daß Nukleinsäure auch beim Passieren
von sehr dünnen Schichten von Glas oder Silicagel ef-
fizient adsorbieren, obwohl die Verweilzeit nur 1 - 30 Se-
kunden beträgt. Es zeigt sich auch, daß eine Bindung
in hohen Natriumchlorid- und Lithiumchloridkonzentra-
tionen erfolgt und chaotrope Salze nicht notwendig sind.
Auch ist bisher eine Kombination aus Anionenaustau-
scher und Silicagel nicht beschrieben, wobei der Anio-
nenaustauscher die Reinigung der Nukleinsäure über-
nimmt und bei den Konzentrationen von 0,25 M - 1,5 M
Salz zwar die Verunreinigungen, wie Metaboliten, Pro-
teine und teilweise RNA, Polysaccharide entfernt wer-
den, aber diese unter den gegebenen Bedingungen
nicht an die nachgeschaltete Silicagelschicht adsorbie-
ren können, und die Silicagelschicht die Entsalzungs-
und Konzentrationsaufgabe übernimmt, wenn die Nu-
kleinsäure im folgenden Schritt mit einer Salzkonzen-
tration vom Anionenaustauscher eluiert wird, die hoch-
genug ist die Nukleinsäure an die Silicagelschicht ad-
sorbieren kann.
Als Puffersalze in den angegebenen Konzentratio-

nen kommen für den Adsorptionsschritt an den mineralischen Träger folgende in Betracht:

Salz	Konzentration
NaCl	3 - 5 M
NaClO ₄	5 - 7 M
Gu-HCl	5 - 7 M
NaI	3 - 5 M

Die Behandlung mit der Salzlösung kann einfach durch Autropten auf den Filter und Absaugen erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Silica-geleichte mit einer Parchloratlösung, pH 6,5 bis 8,5, insbesondere pH 7 bis 8, behandelt. Dies erfolgt zweckmäßig durch Pipettieren und Durchsaugen. Besonders bevorzugt wird hierzu eine Lösung, die 4 bis 8 M NaClO_4 , 5 bis 20 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8 und 0,5 bis 2 mM EDTA enthält, verwendet. Nach dem Entfernen der chaotropen Lösungen, insbesondere der Natriumperchloratlösung, wird vorzugsweise mit wäßrigem Ethanol nachgewaschen, zum Beispiel mit 50 bis 90%-igem Ethanol.

salzhaltigen Fraktion in die Kartusche oder die Säule mit dem Nukleinsäuren unter Hochsalzbedingungen absortierungsgangform sind die jeweiligen Vorrichtungen mit den entsprechenden Adsorptionsmaterialien so aufeinander abgestimmt, daß der Behälter mit dem Anionenaustauscher auf dem Behälter mit dem Nukleinsäure unter hohen Ionenstärken br. denden Material angeordnet

Eine Konditionierung des Materials, das die Nukleinsäuren bei hoher Ionenstärke adsorbieren kann, ist insbesondere bei dieser Vorgehensweise besonders leicht möglich. Die Konditionierung kann bereits durch die hohe Ionenstärke binden kann, mit entsprechend hochkonzentrierten Salzlösungen vorbehandelt wird. Es ist jedoch auch möglich, entsprechend vorbehandelte Materialien zu verwenden, indem beispielsweise das Nukleinsäure adsorbierende Material zunächst mit Salzlösungen hoher Ionenstärke behandelt wird und danach das Lösungsmittel verdampft wird, so daß sich in dem Nukleinsäuren unter hohen Ionenstärken adsorbierenden Material sehr hohe Salzkonzentrationen unmittelbar einstellen, wenn eine wäßrige Lösung damit in Verbindung gebracht wird. Vorteilhaft ist die Konditionierung

ung aufgrund der Tatsache, daß die ersten Volumeneinheiten, die sich durch die Elution der Nukleinsäuren vom Anionenaustauscher von diesem Material lösen noch eine möglicherweise zu geringe Salzkonzentration aufweisen, um hinreichend fest an dem folgenden Material zu adsorbieren. Trifft nun ein relativ verdünnter Elutionsstrom vom Anionenaustauscher auf ein so hochkonzentriertes Material, das Nukleinsäure unter Bedingungen hoher Ionenstärke zu binden vermag, so stellt sich sofort eine hohe Salzkonzentration ein und die Nukleinsäuren werden an diesem Material adsorbiert.

Durch kann die Nukleinsäure mit einem Puffer ho-
 chkonzentriert werden, um dann unmittelbar im Elutionspuffer hoher
 Verdünnung in die Säure-Lösung gegeben werden. Nukleinsäuren können in Gegenwart von
 Salzen wie Natriumidrid, Natriumperchlorat
 oder in einem Glas oder Silicagel gebunden wer-
 den. Wenn die Nukleinsäuren mit der feinen Glas-
 suspension versetzt und längere Zeit in-
 der Suspension gelassen werden, findet eine Bindung der Nukleinsäure an das Sil-
 icium statt. Diese Bindung ist reversibel und kann durch Zugabe von 0,1 M Natrium-
 citrat (pH 6,5) oder 0,1 M Natriumacetat (pH 4,5) wieder gelöst werden. Die Bindung
 ist reversibel und kann durch Zugabe von 0,1 M Natriumcitrat (pH 6,5) oder 0,1 M
 Natriumacetat (pH 4,5) wieder gelöst werden. Die Bindung ist reversibel und kann
 durch Zugabe von 0,1 M Natriumcitrat (pH 6,5) oder 0,1 M Natriumacetat (pH 4,5)

Die Adsorption der Nukleinsäuren an die mineralischen Träger kann überraschenderweise auch durch

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die Isolierung und Präparation von Plasmid-DNA und

genomischer DNA geeignet.

Die Figuren zeigen bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei die verschiedenen Adsorptionsmaterialien für die Nukleinsäuren in einer Vorrichtung vereint sind.

Die Figur 1 zeigt eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, die aus einem Hohlkörper 1 mit einer Einlaßöffnung 7 und einer Auslaßöffnung 8 besteht. Der Hohlkörper besteht vorzugsweise aus Polypropylen (PP), Polyethylen (PE), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyethylenerephthalat (PET) oder Polyacrylnitril (PAN). Im Hohlkörper 1 ist zwischen zwei Fixiereinrichtungen 5, 6 ein pulverförmiges erstes Material aus einem mineralischen Trägermaterial 10 angeordnet. Im Hohlkörper 1 befindet sich ein zweites pulverförmiges Material 11 aus einem mineralischen Trägermaterial zwischen dem ersten Material 10 und der Auslaßöffnung 8. Die ersten und zweiten Materialien 10, 11 weisen unterschiedliche Adsorptionseigenschaften für Nukleinsäuren auf. Die Unterschiede in den Adsorptionseigenschaften werden durch unterschiedliches Adsorptionsverhalten in Puffern hoher bzw. niedriger Ionenstärke bestimmt. Werden zum Beispiel Nukleinsäuren vom ersten Material 10 unter Bedingungen niedriger Ionenstärke gebunden, so muß das zweite Material 11 in der Lage sein, Nukleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke unter Bedingungen hoher Ionenstärke die Nukleinsäure vom ersten Material 10 desorbiert und an dem zweiten Material 11 adsorbiert wird.

Vorzugsweise besteht das erste pulverförmige Material 10 aus einem Anionenaustauscher aus oberflächenmodifizierten Trägermaterialien auf Basis von Agarose, Dextranen, Cellulose, Acrylamid, Polyvinylalkohol, Polystyrol, Glas, Aluminiumoxid, Titanoxid, Zirkonoxid oder Silicagel, insbesondere Anionenaustauscher der oben genannten Art auf Silicagelbasis. Der vorzugsweise basische Ionenaustauscher weist eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, bevorzugt von 10 bis 40 µm, insbesondere 15 bis 25 µm, und einem Porendurchmesser von 1 bis 2.500 nm, vorzugsweise 10 bis 500 nm, insbesondere 200 bis 400 nm, auf.

Das zweite Material 11 ist ein mineralisches Trägermaterial, insbesondere aus Silicagel, Glas, Zeolith, Aluminiumoxid, Titandioxid, Zirkonoxid, Kaolin, Kieselsäure, vorzugsweise ein Silicagel, gegebenenfalls in Form einer Silicagelsuspension. Das zweite Material 11 weist vorzugsweise eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, insbesondere 1 bis 30 µm, bevorzugt 1 bis 5 µm, auf.

Die Einrichtungen 5 und 6 bestehen vorzugsweise aus gesintertem Glas (Fritten) oder Membranen aus Kunststoff, wie Polyethylen, PTFE, Polypropylen, Polystyrol, Nylon oder ein Vlies aus Polypropylen, Poylen, Nylon. Die Porosität der Einrichtungen 5, 6 beträgt 0,1 bis 0,5 µm, bevorzugt 0,1 bis 0,2 µm.

Nach dem Trocknen der Filter erfolgt dann die Elution in üblicher Weise mit einer verdünnten wässrigen Salzlösung, wie z. B. in Anal. Biochem. 101, 339 - 341 (1980) beschrieben. Ein bevorzugtes Elutionsmittel ist 0,5 bis 2 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, enthaltend 0,05 bis 0,2 mM EDTA, im folgenden als TE bezeichnet. Besonders bevorzugt wird ein pH-Wert von 7,5 bis 8,5. Ein anderes geeignetes Elutionsmittel sind verdünnte Detergentslösungen, wie zum Beispiel 0,1% SDS, die jedoch weniger bevorzugt werden.

Es hat sich gezeigt, daß außer Silicagel auch andere mineralische Träger zur Adsorption der Nukleinsäuren geeignet sind, in einer bevorzugten Form wird jedoch Silicagel der Partikelgröße 1 bis 250 µm, bevorzugt 1 bis 50 µm, insbesondere 1 - 5 µm, eingesetzt. Die Entsalzungsschicht kann als eine feste geschüttelte Schicht, die zwischen zwei FE-Fritten eingeschlossen ist, in der Extraktionsssäule eingesetzt werden. Eine andere Ausführungsform beinhaltet die Anwendung der mineralischen Träger in Membranform nach EP 0 323 055 (07.12.1988, 3M, Composition Chromatographic Article).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäuren verschiedener Provenienz getrennt und präpariert werden. Dabei ist es gleichgültig, ob die Nukleinsäuren aus Bakterien, Zellkulturen, Blut, Gewebe, Urin, Viren oder aus Amplifikationsreaktionen, wie PCR (Polymerase Chain Reaction), SSSR (Self-Sustained Sequence Replication), Ligase-Chain-Reaction und ähnlichen Reaktionen stammen, oder ob es sich um markierte Nukleinsäuren, wie in Biotin markierte, fluoreszenzmarkierte oder radikalaktiv markierte Nukleinsäuren handelt. Als Nukleinsäure kommen Nukleinsäuren in einem Größenbereich von 10 Nukleotiden bis 200.000 Nukleotiden in Betracht. Als Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung werden Oligonukleotide von 10 bis 100 Nukleotiden, RNA mit 50 bis 25.000 Nukleotiden, Plasmid-DNA mit 2.500 bis 25.000 Basenpaaren, Cosmid-DNA mit 5.000 bis 60.000 Basenpaaren oder genomische DNA mit 100 bis 200.000 Basenpaaren verstanden.

Die nach Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltene Nukleinsäurefraktion oder -fraktionen werden in Lösungen mit geringer Salzbelastung erhalten. Es ist somit möglich, die für die weitere Prozessierung erforderlichen Pufferbedingungen nachträglich einzustellen. In besonders vorteilhafter Weise wird die an dem Silicagel gebundene Nukleinsäure bereits in dem zur Weiterverarbeitung bestimmten Puffer eluiert. Die isolierten Nukleinsäuren werden für die unterschiedlichsten Anwendungen eingesetzt. Besonders häufig erfolgt die enzymatische Umsetzung mit Restriktionsenzymen, Polymerasen und Ligasen zur Restriktionsanalyse, Sequenzierung, Markierung mit Radioaktivität oder nicht radioaktiven Markern, wie Biotin, FITC, Digoxigenin und der Amplifikation mit Hilfe der PCR, SSSR (Self-Sustained-Sequence Replication) und Ligase-Chain-Reaction.

12 mal aneinandergesetzt hergestellt werden, wobei 96 Proben prozessierbar werden. Der große Vorteil ist dann gegeben, wenn das international standardisierte Mikrotiter-Format verwendet wird.

Die Figur 7 beschreibt eine Vorrichtung, die in einem zylindrischen Hohlkörper 1 mit Einlaßöffnung 7 und Auslaßöffnung 8 ein Anionenaustauschermaterial 10 zwischen zwei Einrichtungen 6 und 5 fixiert enthält. Darauf ist aufgesteckt ein weiterer zylindrischer Hohlkörper in dessen Lumen verschiedene Filterschichten angeordnet sind. Die Filterschichten 20, 21, 22 können aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, PTFE, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschüttelten Diatomeengestein, verklebtes Vlies in Form von Polypropylen, Polyester, Glasfasern und Silica kommen in Betracht. Die Porosität der einzelnen Schichten beträgt vorzugsweise 15 µm bis 500 µm in einer Dicke von 0,1 mm bis 10 mm. Die Porengröße der Filterschicht wird, in Fließrichtung gesehen, von Schicht zu Schicht geringer, in einer typischen Ausführungsform beträgt die Größe der Poren in der Schicht 20 etwa 100 bis 300 µm, in der Schicht 21 30 bis 100 µm und in der dritten Filterschicht 5 bis 30 µm.

Die Figur 8 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung nach Figur 7, wobei als, in Fließrichtung gesehen, oberste Filterschicht 23 eine hydrophobe Schicht eingesetzt wird. Die hydrophobe Trennschicht 23 verhindert die unerwünschte Penetration des rohen Zell-Lysats in die Filterschicht vor Beginn der eigentlichen Filtration. Die hydrophobe Trennschicht 23 besteht vorzugsweise aus versponnenem oder gesintertem Polypropylen, Polyethylen, Polyester oder Polytetrafluorethylen (PTFE)-Fasern, in einer Porosität von 10 µm bis 500 µm und vorzugsweise eine Dicke von 0,1 bis 5 mm.

Die Figur 9 beschreibt eine Filtrationsvorrichtung, die ähnlich aufgebaut ist, wie die in den Figuren 7 und 8 beschriebenen, mit dem Unterschied, daß verschiedene Filterschichten mit abnehmender Porengröße in einer einzigen Filterschicht 12 mit kontinuierlich abnehmender Porengröße verbunden sind. Die asymmetrische Filterschicht 12 ist vorzugsweise mit einer hydrophoben Filterschicht 23 am oberen Ende, in Fließrichtung gesehen, versehen. Die asymmetrische Filterschicht 12 besteht vorzugsweise aus versponnenem Polypropylen oder Polyester, kommerziell erhältlich sind Profile, beispielsweise von Pall Filtertechnik, Dreieck, Frankfort, mit Porositätsabstufungen von 500 bis 50 µm, 100 bis 10 µm, 50 bis 5 µm sowie 10 bis 0,1 µm. Die Dicke der asymmetrischen Filterschicht sollte vorzugsweise 1 mm bis 10 mm betragen.

Die Figur 10 beschreibt Filtrationsanordnungen zur Abtrennung von Nukleinsäuren im erfindungsgemäßen Sinne wobei auf die Filterkonfigurationen der Figur 9 zurückgegriffen wird und wobei eine asymmetrische Filterschicht mit einer hydrophoben Filterschicht 23 versehen ist. Im Hohlkörper 1 befindet sich anstelle des Anionenaustauschers 10 ein mineralischer Träger 11, der in der

Tragt vorzugsweise 10 bis 500 µm.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung zeigt die Figur 2. Dort ist das erste Material 10 und das zweite Material 11 so im Hohlkörper 1 angeordnet, daß die Materialien 10, 11 direkt aneinander grenzen und zwar in getrennten Schichten, die gemeinsam von den Fixiereinrichtungen 5, 6 gehalten werden. Vorzugsweise kann das Material durch eine Trenneinrichtung 13 getrennt werden, wobei die Trenneinrichtung 13 eine poröse Scheibe, vorzugsweise aus gesintertem Glas, oder eine Kunststoffmembran, oder Gewebe, vorzugsweise aus Nylon, ist.

Die Figur 3 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei das zweite Material 11 in dem einen Kanal bildenden Auslaß 18 zwischen den Fixiereinrichtungen 5, 15 fixiert ist. Die einen Kanal bildende Auslaßöffnung 18 weist einen geringeren Querschnitt als der Hohlkörper 1 auf und mündet vorzugsweise in einem Kanal 18a, dessen Querschnitt geringer als derjenige des Kanals 18 ist. Das erste Material 10 befindet sich im Lumen des Hohlkörpers 1 im Bereich des größeren Durchmessers und ist durch die Einrichtung 6, 16 fixiert. Es kann dabei vorgeteilt sein, das erste und zweite Material 10, 11 aneinander grenzen zu lassen, so daß diese nur durch eine gemeinsame Einrichtung 17 getrennt sind (siehe Figur 4).

Die Figur 5 beschreibt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die im Hohlkörper neben den Schichten aus einem ersten und zweiten Material 10, 11 eine weitere Schicht 12 aufweist, die über dem ersten Material 10 angeordnet ist. Die Schicht 12 ist als mechanische Filtereinrichtung ausgebildet. Vorzugsweise ist die dritte Schicht 12 ein asymmetrischer Filter, wobei die Porengröße des Filters in Fließrichtung der Probe, also von Zuführungsoffnung 7 zur Auslaßöffnung 8 bzw. 18, abnimmt. Damit können auch noch in der Probe befindliche Zelltrümmer entfernt werden, ohne daß die Gefahr einer Verstopfung der Vorrichtung besteht.

Die Materialien 10 und 11 können in sämtlichen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung entweder pulverförmig und/oder als Preßkörper ausgebildet sein. Wenn die Materialien 10, 11 in Partikelform vorliegen, kann es empfehlenswert sein, diese in einem Trägernetz aus inerten Kunststoffen einzubetten, so daß die Schichten in Form einer Membran vorliegen-gemäß US-PS 4,810,381 und US-PS 4,699,717 sowie in der DE 41 27 276 vorgeschlagen. Das Trägernetz kann aus Teflon bestehen.

Die Figur 6 beschreibt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei acht einzelne, getrennte Vorrichtungen gemäß Figur 2 aneinander grenzen und eine Achtereinheit bilden. Der Vorteil dieser Ausführungsform, die mit jeder der in 1 - 5 beschriebenen Einzeleinrichtungen durchführbar ist, liegt in der parallelen Präparation von 8 Proben - unter Zuhilfenahme von Mehrkanalpipetten. Diese Form kann auch

Der Vorteil besteht darin, daß der Einsatz von teuren Laboreinrichtungen vermieden werden kann. Die Elution kann beispielsweise durch Schwerkraft bewirkt werden und muß nicht mittels sogenannter HPLC-Geräte durchgeführt werden.

Die Herstellung einer Silicagel-Anionenaustauscher/Silicagel-Extraktions-Säule erfolgt vorzugsweise dadurch, daß ein Polypolyäthylen-Gefäß passend in ein handelsübliches 1,5 ml Zentrifugen-Gefäß, unten mit einer 50 µm Polypolyäthylen-Fritte (poröse Filterschicht aus Polypolyäthylen, 1,5 mm dick) verschlossen und mit 50 mg Silicagel (Lichrosphere Si 100, 16 - 24 µm; Merck, Darmstadt, FRG) überschichtet wird. Diese Silicagelschicht wird mit einer zweiten porösen Polypolyäthylen-Fritte verschlossen und die zweite Fritte mit 100 mg Silicagel-Anionenaustauscher (Ciagen, Fa. Diagen, Düsseldorf, FRG), Partikelgröße 16 bis 23 µm überschichtet und abschließend mit einer dritten porösen Polypolyäthylen-Fritte verschlossen.

Die Herstellung einer Agarose-Anionenaustauscher/Silicagel-Extraktions-Säule erfolgt vorzugsweise dadurch, daß ein Polypolyäthylen-Gefäß unten mit einer 50 µm Polypolyäthylen-Fritte (poröse Filterschicht aus PE, 1,5 mm dick) verschlossen und mit 50 mg Silicagel (Lichrosphere Si 100, 16 - 24 µm) überschichtet wird. Diese Silicagelschicht wird mit einer zweiten Polypolyäthylen-Fritte verschlossen und die zweite Fritte mit 0,5 ml DEAE-Separose FF (Fa. Pharmacia, Freiburg, FRG), Partikelgröße 45 - 165 µm, überschichtet und abschließend mit einer dritten porösen Polypolyäthylen-Fritte verschlossen.

Die Herstellung einer Anionenaustauscher-Membran/Silicagel-Membran-Extraktions-Säule nach Figur 3 erfolgt vorzugsweise dadurch, daß in ein Polypolyäthylen-Gefäß auf eine Polypolyäthylen-Fritte eine 1 mm dicke Empore/Silicagelmembrane (3) (3M Corp. St. Paul, MN, USA), ein 0,2 mm dickes Polypolyäthylen-Vlies und 1 mm dicke Anionenaustauscher-Membrane bestehend aus 16 bis 23 µm Ciagen Anionenaustauscher Partikel (Diagen GmbH, Düsseldorf, FRG) platziert wird.

Die Herstellung einer Anionenaustauscher/Silicagel-Mikrofilterstreifen-Extraktions-Säule erfolgt wie beschrieben. Ein Mikrofilterstreifen mit 8 oder 96 Positionen wird mit einer DEAE-Silicagel-Membran und einer Silicagel-Membran gefüllt. In eine Bohrung eines Mikrofilterstreifens werden eine 0,75 mm dicke Silicagelmembran, hergestellt aus Sident 9 Silicagelpartikeln (Fa. Degussa, Frankfurt, FRG), eine 0,2 mm dicke Polypolyäthylen-Vlies-Schicht und eine 0,8 mm dicke Anionenaustauscher-Membran hergestellt aus Ciagen, 16 - 23 µm (Fa. Diagen, Düsseldorf, FRG) eingepaßt. Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele weiter erläutert.

Lage ist, Nukleinsäuren in hochkonzentrierten Salzlösungen zu adsorbieren.

Die Figur 11 beschreibt eine Konfiguration in einer Verbindung der Figuren 9 und 10. Dabei wird der Vorrichtung, die in Figur 2 beschrieben wird, lediglich ein Filteraufsatz bestehend aus einem asymmetrischen Filter 12 und einer hydrophoben Filterschicht 23 zugeordnet etwa durch Einstechen einer entsprechenden ausgebildeten Kartusche.

Sämtliche Einzelvorrichtungen, die in den Figuren 1 bis 5 und 7 bis 11 näher beschrieben worden sind, lassen sich in einem Mikrofilterstreifen bestehend aus 8 aneinandergesetzten Einzelvorrichtungen anordnen. Beispielhaft ist dies noch einmal in den Figuren 12 bis 14 dargestellt.

Die Figur 12 zeigt eine Filtrationsvorrichtung mit Anionenaustauscher, wobei ein Mikrofilterstreip oder eine Kartusche auf dem zylindrischen Hohlkörper 1, der eine Anionenaustauscherschicht zwischen den Einrichtungen 5, 6 fixiert enthält.

Die Figur 13 betrifft eine Filtrationsvorrichtung, die anstelle des Anionenaustauschermaterials ein mineralisches Trägermaterial besitzt, welches in der Lage ist, Nukleinsäuren in hohen Salzkonzentrationen zu adsorbieren. Vorzugsweise befindet sich eine Silicagelschicht 11 angeordnet zwischen zwei Einrichtungen 5 und 6.

Die Figur 14 zeigt eine Kombination der Anordnung gemäß Figur 2 sowie einer asymmetrischen Filterschicht mit hydrophober Filterschicht, die über dem Hohlkörper 1, in Fließrichtung der Probe gesehen, angeordnet ist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, insbesondere die in Figur 3 oder 4 näher erläuterte Vorrichtungen, sind besonders vorteilhaft, da die Elution der Nukleinsäure aus dem zweiten Material 11 mit nur sehr geringen Flüssigkeitsmengen gewährleistet ist.

Der Durchfluß der Probe durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird grundsätzlich durch die Schwerkraft bewirkt, jedoch kann zur Beschleunigung der Reinigung und Trennung der Nukleinsäuren ein Überdruck an der Öffnung 7 bzw. ein Unterdruck an der Öffnung 8 bzw. 18 angelegt werden. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendet als asymmetrische Filter solche aus gesintertem Glas mit abnehmender Porengröße oder übereinander geschichtete Kunststoffmembranen mit abnehmender Porengröße in Fließrichtung der Probe durch den Hohlkörper.

Nukleinsäuren aus Zellen und anderen Quellen können ohne Zentrifugation, Phenol/Chloroform-Extraktion und ohne Alkoholfällung erhalten werden, wobei die Nukleinsäure am Ende des Verfahrens in konzentrierter Form in Wasser oder Puffer niedriger Salzkonzentration vorliegt und somit direkt für anschließende enzymatische Reaktionen einsetzbar ist. Ein weiterer

Beispiel 1**Präparation von Plasmid DNA**

Eine 100 ml Kultur in LB-Ampicillin Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert.

Um die Zelle zu lysieren, werden 10 ml 0,2 M Na-OH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird mit 10 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure neutralisiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird 30 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Das Phagenpellet wird in 0,5 ml 0,5 M Guanidin-HCl, 1% Triton X-100 resuspendiert und 10 Minuten bei 70°C lysiert. Das Phagenlysat wird auf einer Vakuumkammer direkt durch eine Extraktionssäule nach Beispiel 3 gesaugt und adsorbiert. Die Extraktionssäule wird mit 1 ml 0,75 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0, 1 ml 0,75 M NaClO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 gewaschen und mit 7 M Guanidin, 15% Ethanol, 50 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht eluiert und an die SiO₂-Schicht adsorbiert.

Beispiel 3**Präparation von M13 Einzelstrang DNA**

1 ml M13 Phagensuspension werden mit 0,5 ml 30% PEG 6000, 1,5 M NaCl versetzt und nach 10 Minuten Inkubation auf Eis 15 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Das Phagenpellet wird in 0,5 ml 0,5 M Guanidin-HCl, 1% Triton X-100 resuspendiert und 10 Minuten bei 70°C lysiert. Das Phagenlysat wird auf einer Vakuumkammer direkt durch eine Extraktionssäule nach Beispiel 3 gesaugt und adsorbiert. Die Extraktionssäule wird mit 1 ml 0,75 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0, 1 ml 0,75 M NaClO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 gewaschen und mit 7 M Guanidin, 15% Ethanol, 50 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht eluiert und an die SiO₂-Schicht adsorbiert.

Beispiel 4**Präparation von genomischer DNA aus Blut**

1 ml citrat-stabilisiertes, humanes Vollblut wird zur Lyse der Erythrozyten mit 1 ml 1% Saponin versetzt und sofort nach dem Mischen, 5 Minuten bei 2.500 g abzentrifugiert. Die Leukozyten werden in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und nochmals pelletiert. Die gewaschenen Leukozyten werden in 1 ml 500 mM Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 0,1 ml Proteinase K (10 mg/ml) 2 Stunden bei 50°C lysiert. Das Leukozyten-Lysat wird sofort auf die Agarose/Anionenaustauscher-Silicagel/Extraktionssäule pipettiert und mit 1 ml 0,25 M NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und 1 ml 0,25 M NaClO₄, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen. 1 ml Citrat-stabilisiertes, humanes Vollblut wird unter Vakuum, durch eine Anionenaustauscher-Silicagel-Säule gesaugt. Die Leukozyten werden dabei in der Matrix eingefangen, wogegen die wesentlich kleineren Erythrozyten durch die Matrix durchwandern. Die Extraktionssäule wird zweimal mit 1 ml PBS-Puffer nachgewaschen. Die eingefangenen Leukozyten werden mit 10% Tween 10, 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Zellbruchstücke und Proteine werden mit zweimal 1 ml 1 M Guanidin-HCl, pH 7,0 ausgewaschen und die DNA mit 7M NaClO₄, 50mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Säule eluiert.

Beispiel 2**Parallele Präparation von Plasmid DNA**

8 DEAE-Silicagel-Membran/Silicagel-Extraktionssäulen werden auf einer Vakuumkammer aufgesetzt. 8 x je 1 ml eines Plasmid DNA enthaltenen Zell-Lysates werden unter Vakuum (20 bis 750 mbar) durch die Extraktionssäulen gesaugt. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaClO₄ gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Spuren an EtOH werden eventuell durch eine weitere Zentrifugation entfernt. Anschließend wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 durch Zentrifugieren eluiert und in neuen 1,5 ml Röhren aufgeteilt. Die eluierte DNA kann dann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

10 Um die Zelle zu lysieren, werden 10 ml 0,2 M Na-OH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird mit 10 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure neutralisiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird 30 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgehoben. 1 ml klares Zell-Lysat wird auf eine DEAE-Anionenaustauscher/Silicagel-Zentrifugations-Extraktions-Säule pipettiert und die Probe durch die Austauscherschicht 1 Minute bei 2.500 g zentrifugiert. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaClO₄ gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Spuren an EtOH werden eventuell durch eine weitere Zentrifugation entfernt. Anschließend wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 durch Zentrifugieren eluiert und in neuen 1,5 ml Röhren aufgeteilt. Die eluierte DNA kann dann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

Beispiel 5

Präparation, Entsalzung und Konzentration von DNA im Mikrotiterformat

96 x 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL 1 Blue E coli Zellen, werden im 2 x YT Medium 18 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Vertiefungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2.500 g pelletiert. Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A in die Mikrotiterplattenverteilungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einen Vibrations-Schüttler resuspendiert.

Die Zellen werden durch die Zugabe von je 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS 5 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln lysiert. Anschließend werden je 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure, pH 5,5 - 6,0 Neutralisationspuffer zugegeben, die einzelnen Nüppel mit einer Kappe verschlossen und gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wird die Probe 30 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellbruchstücke und das präzipitierte SDS zu pelletieren. Der Überstand wird mit einer 8-Kanal-Multichannel-Pipette vorsichtig abgehoben und in die 96er Mikrotiterplatte mit einer DEAE-Silicagelmembrane und Silicagelmembrane pipettiert. Nach der Überführung aller 96 Proben werden die Proben durch Anlegen eines Vakuums an eine Filtrationsplatte durch die Mikrotiterplatte gesaugt. Die DNA wird dabei an die Anionenaustauscher-Schicht adsorbiert, während unter diesen speziellen Bedingungen Proteine, RNA und Metabolite nicht adsorbiert werden.

Die Extraktionsssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaClO₄ gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionsssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Anschließend wird die von Salz befreite DNA in konzentrierter Form mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 von der Silicagel-Schicht in eine weitere Mikrotiterplatte eluiert.

Die Herstellung der Zell-Lysate mit Hilfe der Zentrifugation ist ein langwieriges und aufwendiges Verfahren. Die Limitierung ist vor allem dann gegeben, wenn viele Proben routinemäßig präpariert werden müssen. Die Zentrifugation hat den Nachteil, daß sie sich nicht automatisieren läßt.

Ein weiterer Gegenstand (und Verfahren) der Erfindung ist eine Vorrichtung und ein Verfahren zur automatischen Durchführung des Verfahrens ohne Zentrifugation in Form einer Filtrationseinheit, die der eigentlichen Reinigung der Nukleinsäure vorgeschaltet ist.

Dabei wird die Probe nach bekannter Weise mit Proteinasen, Detergentien und/oder Temperatur oder Alkali lysiert. Dieses rohe Lysat wird direkt auf den Filtrationsaufsatz dekantiert, überführt oder pipettiert. Die Filterschicht des Filtrationsaufsatzes ist so aufgebaut, daß ein Verstopfen der Filter durch die Zelltrümmer, ausgefallene Proteine oder Detergentien vermieden wird. Das Zell-Lysat wird durch die Filterschicht mit einem Stempel oder Überdruck durchgedrückt oder unter Anlegen eines Vakuums durchgesaugt. Dabei werden alle ungelösten Bestandteile zurückgehalten und das klare Lysat tropft direkt auf die Adsorptionsschicht. Durch die Wahl der geeigneten Adsorptionsbedingungen wird die Nukleinsäure an der Adsorptionsschicht adsorbiert. Die Filtrationseinheit mit dem Filterkuchen wird von der Adsorptionseinheit abgetrennt, verworfen oder für die Analyse des Filterkuchens aufgehoben. Die Adsorptionseinheit wird mit geeigneten Lösungsmitteln oder Puffern nachgewaschen, um unerwünschte Bestandteile zu entfernen und die erwünschte Probe wird zum Schluß mit einem geeigneten Elutionsmittel eluiert.

Beispielsweise läßt sich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Plasmid DNA ohne eine Klar-Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge präparieren. 96 x 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL 1 Blue E coli Zellen, werden im 2 x YT Medium 18 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Vertiefungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2.500 g pelletiert. Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A in die Mikrotiterplattenverteilungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einem Vibrations-Schüttler resuspendiert. Die des Filtrationsaufsatzes überführt und mit 0,25 ml 0,2 M NaOH/1% SDS versetzt. Die Probe wird 5 Minuten auf einen Vibrationschüttler geschüttelt oder mit einem Stempel oder einer Kiebelde verschlossen und gemischt, oder durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren.

Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur zur Lyse wird zur Neutralisation der NaOH und Präzipitation des SDS 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zugegeben und nach einem der oben beschriebenen Verfahren gemischt. Dieses rohe Zell-Lysat wird nun statt einer Zentrifugation auf einer Vakuumkammer bei 10 mbar - 800 mbar Vakuum durch die Filtrationsschicht gesaugt. Eine asymmetrische oder eine stufenweise Porosität im Bereich 200 µm bis 5 µm aufweisende Filterschicht mit einer Dicke von 2 - 10 mm hält die Zellbruchstücke und anderen ungelösten bzw. präzipitierten Bestandteile zurück ohne zu verstopfen. Das Plasmid DNA enthalten- de, klare Zell-Lysat tropft durch die Filterschicht auf die Adsorptionsschicht (Anionenaustauscher oder Silicagel) und die DNA wird adsorbiert, wogegen Proteine, RNA und andere zelluläre Metabolite unter den gegebenen Salzbedingungen nicht binden. Die Filtration ist

RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkohol-Pellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

Beispiel 7

Präparation von Plasmid DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 8

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pellettieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Filtrationsvorrichtung überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 8 gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkohol-Pellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

Beispiel 8

Präparation von Plasmid DNA an einer Silicagel-Schicht mit einer Vorrichtung nach Figur 10

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pellettieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 10 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,5 ml 5,5 M Guanidinium-HCl, 0,25 M K-Acetat, pH 5,5 zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um

nach ca 10 bis 60 Sekunden beendet. Der Filtrationsaufsatz wird abgenommen und zusammen mit dem Filterkuchen verworfen.

Die gebundene DNA wird mit 1 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl pH 7,0 und 2 mal mit 1 ml 1,5 M NaClO₄, 10 mM Na-Acetat, pH 6,5 gewaschen und mit 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 von Anionenaustauscher eluiert und nach Passieren der Trennschicht aus einem Nylonnetz oder PV-Vlies unter den hohen Salzkonzentrationen sofort an die Silicagelschicht gebunden. Dabei binden die Proteine und RNA bei 1 M - 2 M NaClO₄ nicht an die Silicagelschicht und werden ausgewaschen. Die Silicagelschicht wird zum Entfernen der restlichen Spuren an Proteinen mit 1 ml 7 M Guanidinium HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen. Die Hochsalzlösung an 7M NaClO₄ wird zweckmäßigerweise mit 1 ml 70% EtOH, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und 1 ml 90% Ethanol/Wasser oder 1 ml 90% Aceton/Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen wird die Plasmid DNA salzfrei und in konzentrierter Form mit 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5 eluiert.

Auf diese Weise läßt sich die Plasmid DNA in kürzester Zeit ohne Zentrifugation, Phenol/Chloroform-Extraktion und ohne Alkoholfällung mit einer Ausbeute von 50% bis 80% in konzentrierter Form isolieren. Bei der Verwendung einer beschriebenen Mikrofilterplattenversion lassen sich 96 Plasmid-Minipreps von 1 - 2 ml E.coli Kulturen mit einer Ausbeute von 1 - 10 µg DNA in ca. 60 Minuten präparieren von einer Person. Die bisher bekannten Verfahren benötigen dazu 6 bis 12 Stunden.

Beispiel 6

Plasmid Miniprep mit einer Vorrichtung nach Figur 7

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pellettieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 7 überführt. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um

8,0 eluiert.

Beispiel 10

Präparation von 8 x 1 ml M13 DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 13

8 x 1 ml M13 Phagensuspension werden mit 0,5 ml

30% PEG 6000, 1,5 M NaCl versetzt und 10 Minuten

auf Eis inkubiert. Die Proben werden auf eine Vorrich-

tung nach Abb. 13 überführt und das Phagenlysat wird

nach Figur 13 gesaugt und filtriert. Das Phagenpellet

wird durch das Durchsaugen von 7M Guanidin-HCl, pH

7,0 lysiert und die DNA gleichzeitig an die Silicagel-

schicht 11 adsorbiert. Die Extraktionsssäule wird 2 mal

mit 1 ml 7 M Guanidin-HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0

gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktions-

ssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM

NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90%

Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft

durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen

1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymati-

schon Reaktion wie zum Beispiel Restriktionspaltung,

Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation einge-

setzt werden.

Beispiel 11

Präparation von 8 x 12 Plasmid DNA mit einer Vorrich-

tung nach Figur 14

96 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 2.500

g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zell-Pel-

lets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA,

pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die

Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie ver-

schlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei

Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25

ml 3 M K-Acetat 2 M Essigsäure zur Neutralisation zu-

gegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer

aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar

durch die Vorrichtung-gesaugt. Alternativ kann die Pro-

be mit Überdruck durch die Filtrationsschichten ge-

drückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrations-

vorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den

Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem

ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionsssäule

wird 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH

7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu

entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO₄, 15% Ethanol,

10 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-

Beispiel 9

Präparation von 8 x Plasmid DNA in einem Mikrotiter-

streifen

8 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei

10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die

Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM

EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und

in die Vorrichtung nach Figur 14 überführt. Zur Zell-Lyse

werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension

in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrich-

tung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlos-

sen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtem-

peratur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-

Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben,

gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze

Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt

und das Zell-Lysat mit 20mbar - 800 mbar durch die Vor-

richtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Über-

druck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden.

Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abge-

nommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstük-

ken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen

SDS verworfen. Die Extraktionsssäule wird

gewaschen und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewa-

schon und 2 mal mit 1 ml 7 M NaClO₄, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0

gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktions-

ssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM

NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90%

Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft

durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen

1,5 ml Röhrchen auf-

gefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymati-

schon Reaktion wie zum Beispiel Restriktionspaltung,

Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation einge-

setzt werden.

8 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei

10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die

Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM

EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und

in die Vorrichtung nach Figur 14 überführt. Zur Zell-Lyse

werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension

in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrich-

tung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlos-

sen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtem-

peratur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-

Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben,

gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze

Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt

und das Zell-Lysat mit 20mbar - 800 mbar durch die Vor-

richtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Über-

druck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden, ab-

genommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstük-

ken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen

SDS verworfen. Die Extraktionsssäule wird

gewaschen und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewa-

schon und 2 mal mit 1 ml 7 M NaClO₄, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0

gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktions-

ssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM

NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90%

Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft

durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen

1,5 ml Röhrchen auf-

gefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymati-

schon Reaktion wie zum Beispiel Restriktionspaltung,

Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation einge-

setzt werden.

8 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei

10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die

Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM

EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und

in die Vorrichtung nach Figur 14 überführt. Zur Zell-Lyse

werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension

in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrich-

tung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlos-

sen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtem-

peratur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-

Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben,

gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze

Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt

und das Zell-Lysat mit 20mbar - 800 mbar durch die Vor-

richtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Über-

druck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden, ab-

genommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstük-

ken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen

SDS verworfen. Die Extraktionsssäule wird

gewaschen und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewa-

schon und 2 mal mit 1 ml 7 M NaClO₄, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0

gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktions-

ssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM

NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90%

Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft

durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen

1,5 ml Röhrchen auf-

gefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymati-

schon Reaktion wie zum Beispiel Restriktionspaltung,

Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation einge-

setzt werden.

8 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei

10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die

Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM

EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und

in die Vorrichtung nach Figur 14 überführt. Zur Zell-Lyse

werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension

in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrich-

tung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlos-

sen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtem-

peratur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-

Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben,

gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze

Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt

und das Zell-Lysat mit 20mbar - 800 mbar durch die Vor-

richtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Über-

druck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden, ab-

genommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstük-

ken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen

SDS verworfen. Die Extraktionsssäule wird

gewaschen und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewa-

schon und 2 mal mit 1 ml 7 M NaClO₄, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0

gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktions-

ssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM

NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90%

Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft

durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen

1,5 ml Röhrchen auf-

gefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymati-

schon Reaktion wie zum Beispiel Restriktionspaltung,

Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation einge-

setzt werden.

8 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei

10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die

Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM

EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und

in die Vorrichtung nach Figur 14 überführt. Zur Zell-Lyse

werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension

in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrich-

tung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlos-

sen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtem-

peratur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-

Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben,

gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze

Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt

und das Zell-Lysat mit 20mbar - 800 mbar durch die Vor-

richtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Über-

druck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden, ab-

genommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstük-

ken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen

SDS verworfen. Die Extraktionsssäule wird

gewaschen und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewa-

schon und 2 mal mit 1 ml 7 M NaClO₄, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0

gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktions-

ssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM

NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90%

Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft

durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen

1,5 ml Röhrchen auf-

gefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymati-

schon Reaktion wie zum Beispiel Restriktionspaltung,

Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation einge-

setzt werden.

8 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18

Schicht 10 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht 11 gebunden. Die Extraktionsssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionsssäule vorhandenen Ethanol-H₂O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 96 Proben mit je 50 µl 1 M Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion, wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

Beispiel 12

Präparation von Plasmid-DNA ohne Konditionierung

Eine 3 ml Kultur in LB-Ampicillin-Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNAse A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, 18

M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird 15 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert und der Überstand vor-

richtig abgehoben. Das klare Zell-Lysat wird auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Extraktionsssäule pipettiert und die Probe durch die Austauscherschicht durchgesaugt. Die Extraktionsssäule wird mit 0,8 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol, 10

mm Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Protein zu entfernen. Die DNA wird mit 0,7 ml 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 auf eine Extraktionsssäule mit einer Glasfasermembran gesaugt. Die eluierte DNA-Lösung in 7 M NaClO₄ wird durch die

Glasfasermembran gesaugt und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol/ 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/ Wasser gesaugen. Säuren an Ethyl werden ebenfalls durch ein Durchschie-

Spiert an Licht werden sechs Stunden vor dem Einbau mit 10 μ l 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml-Röhrchen aufgefangen.

Beispiel 13

Präparation von Plasmid-DNA mit Konditionierung

Eine 3 ml Kultur in LB-Ampicillin-Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5 000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNAse A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 1,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben

Patentansprüche

vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird 15 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgehoben. Das klare Zell-Lysat wird auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Extraktionssäule pipettiert und die Probe durch die Austauscherschicht durchgesaugt. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu eluieren und mit 0,8 ml 1 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 5,0 konditionieren. Die DNA wird mit 0,7 ml 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 auf eine Extraktionssäule mit einer Glasfasermembran gesaugt. Diese Glasfasermembran wurde vorher mit 0,2 ml 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 konditioniert, um eine bessere Adsorption der DNA zu erreichen und Verluste in den ersten Tropfen zu vermeiden. Die eluierte DNA-Lösung in 7M NaClO₄ wird anschließend auf einer Vakuumvorrichtung durch die Glasfasermembran gesaugt und dabei direkt an die Silicagelschicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Spuren an EtOH werden eventuell durch ein Durchsaugen von Raumluft entfernt. Zum Schluß wird die DNA mit 100 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefäht.

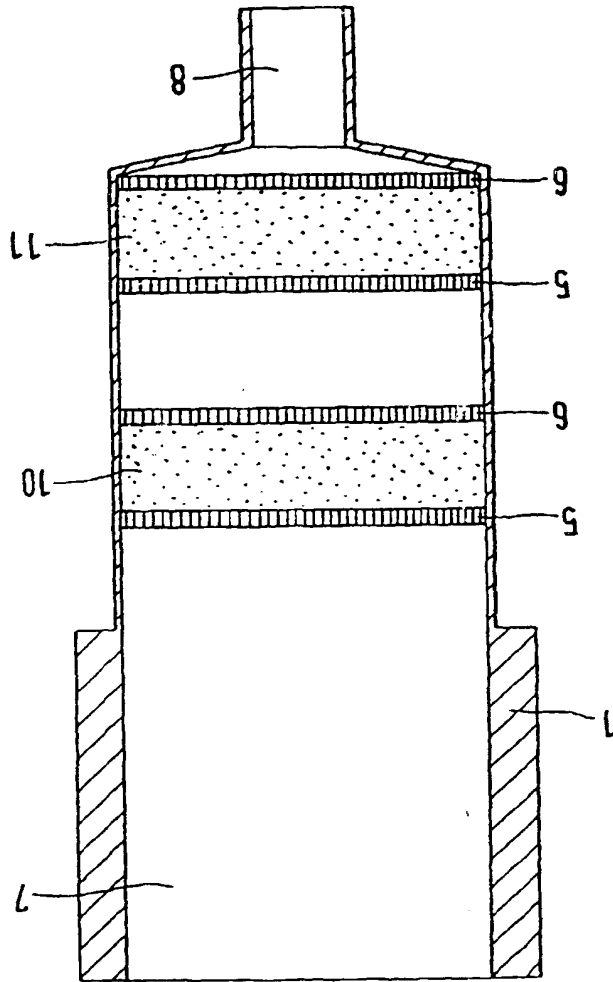
Die Vorkonditionierung kann auch durch eine mit 7 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 getränkte und getrocknete Membran erreicht werden. Durch die Vorkonditionierung werden die Adsorptionsverluste von 30 % auf unter 5% reduziert und die Gesamtausbeute der DNA erhöht sich von 50 - 60% auf 80 - 90%.

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschossen und die Zelltrümmer entfernt werden durch Filtration an einer Filterschicht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Filierschicht aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, PTFE, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschüttelter Diatomeenerde, wie Cel-lit oder Silicagel besteht.

3. Verfügen nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei die Nukleinsäure aus einer PCR- (Polymerase Chain Reaction), SSSR- (Self-Sustained-Sequence Replication), Ligase-Chain-Reaction stammt

FIG. 1



13

55

50

45

40

35

30

25

20

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei markierte Nukleinsäuren insbesondere mit Biotin markierte Nukleinsäuren fluoreszenz markierte Nukleinsäuren, wie mit Fluorescein-Isothiocyanat markierte oder radioaktiv markierte Nukleinsäuren eingesetzt werden.
- 10
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäuren aus Bakterien, Zellkulturen, Blut, Gewebe, Urin, Viren oder anderen biologischen Quellen stammt.
- 5
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nukleinsäure 10 Nukleotide bis 200.000 Nukleotide umfaßt.

FIG. 2

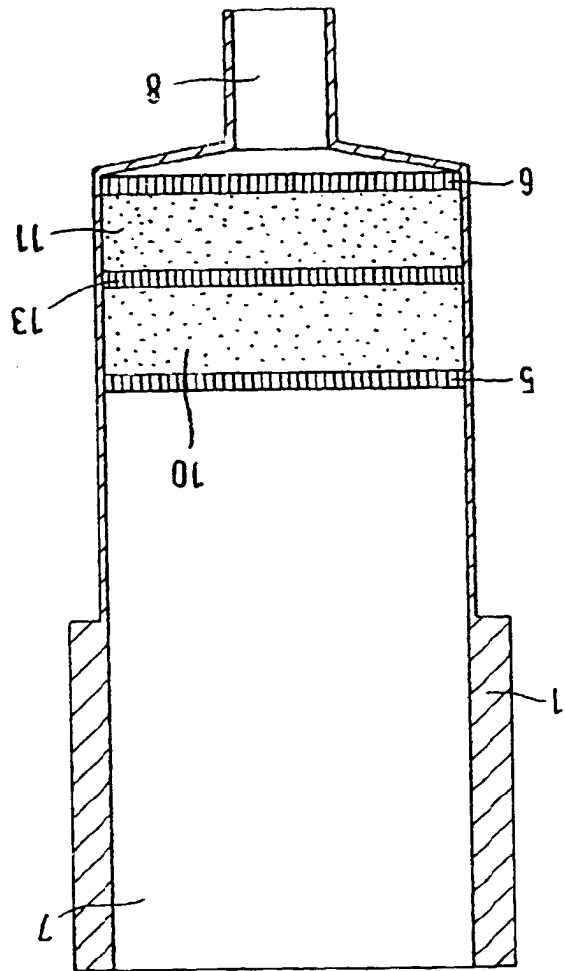
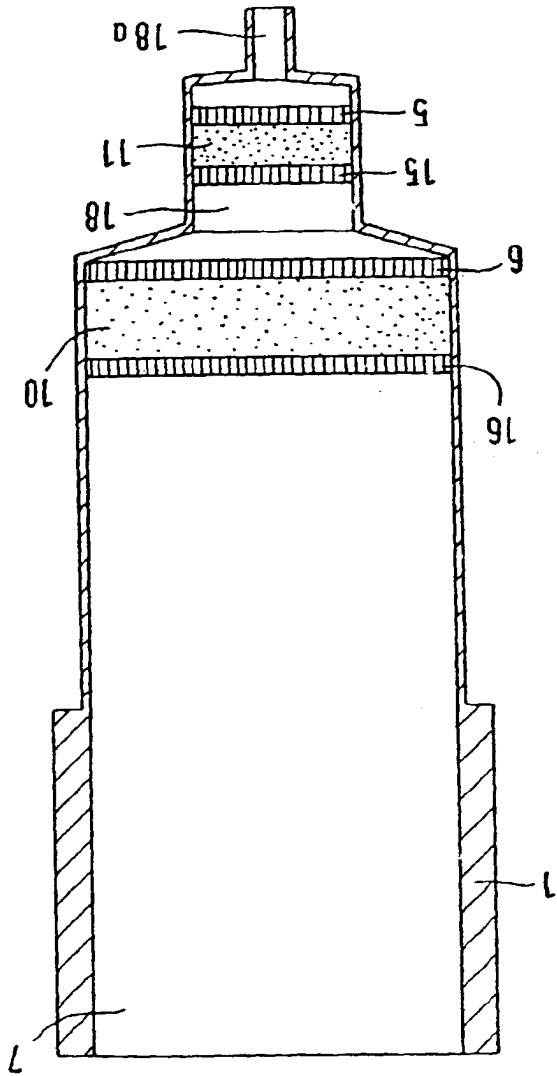


FIG. 3



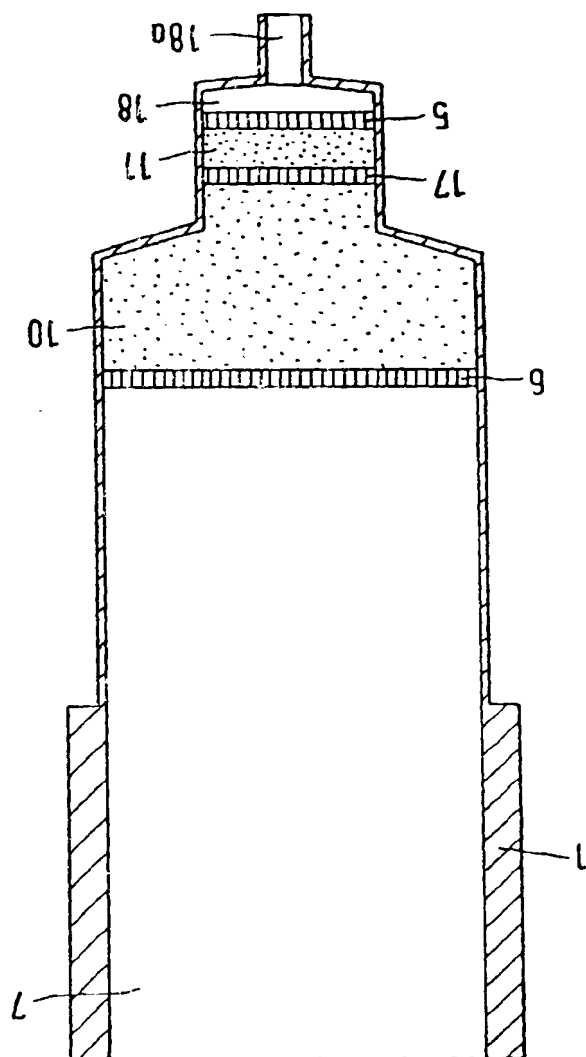


FIG. 4

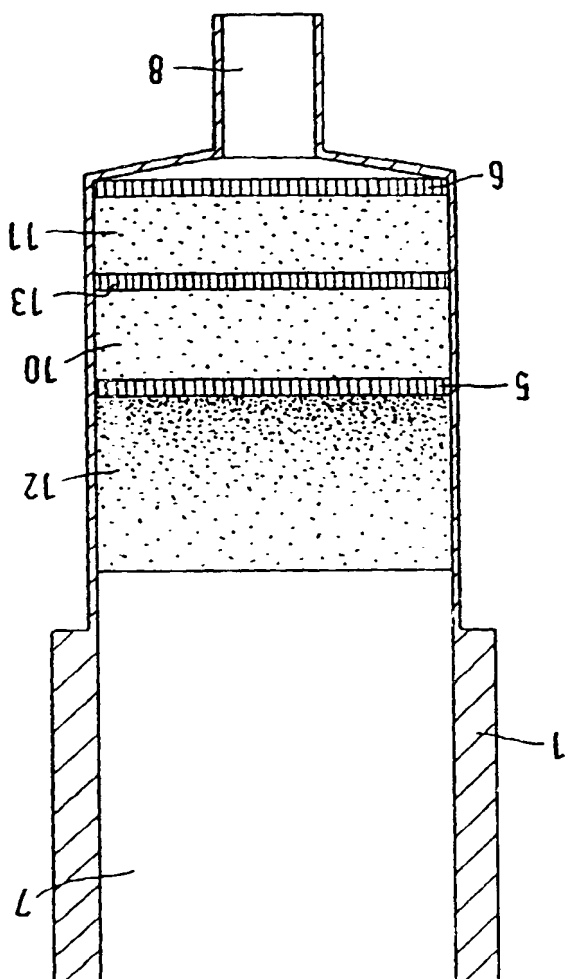


FIG. 5

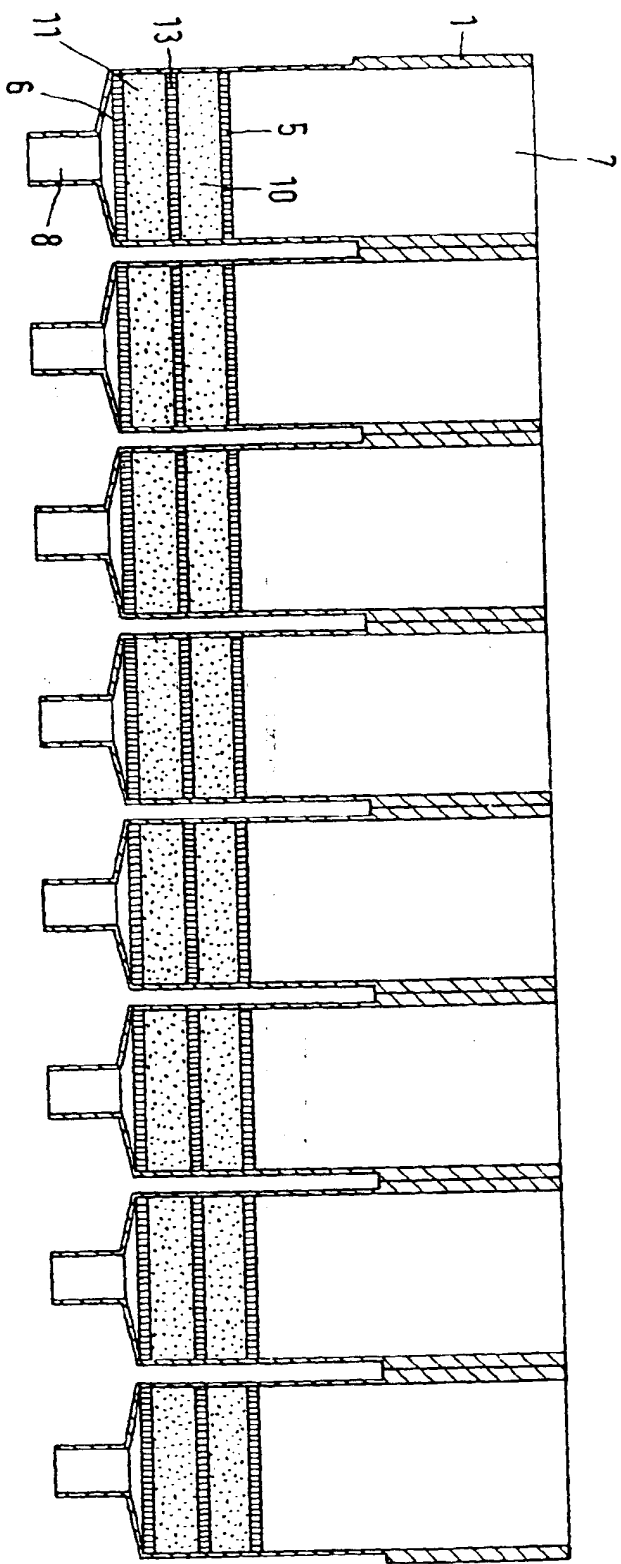
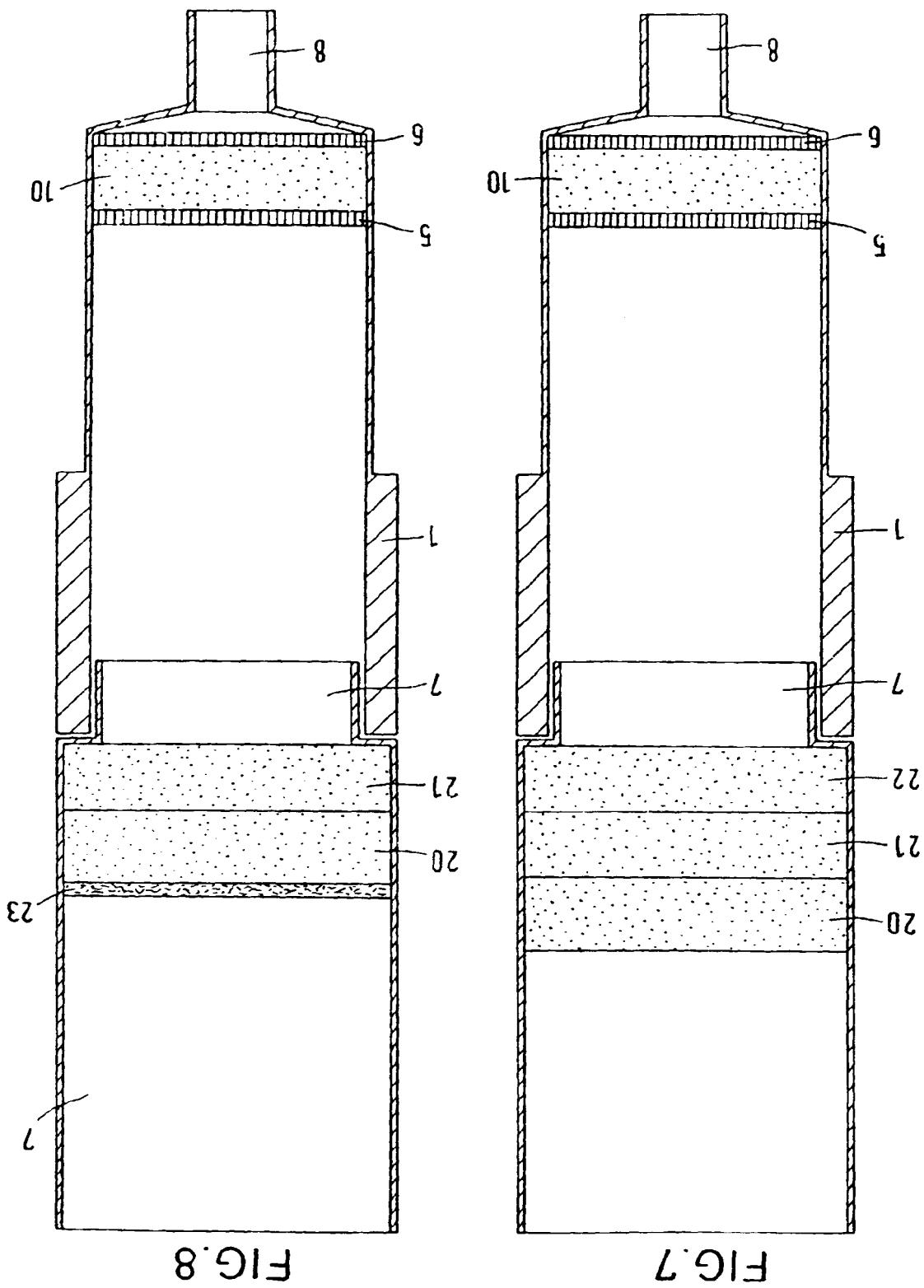


FIG. 6



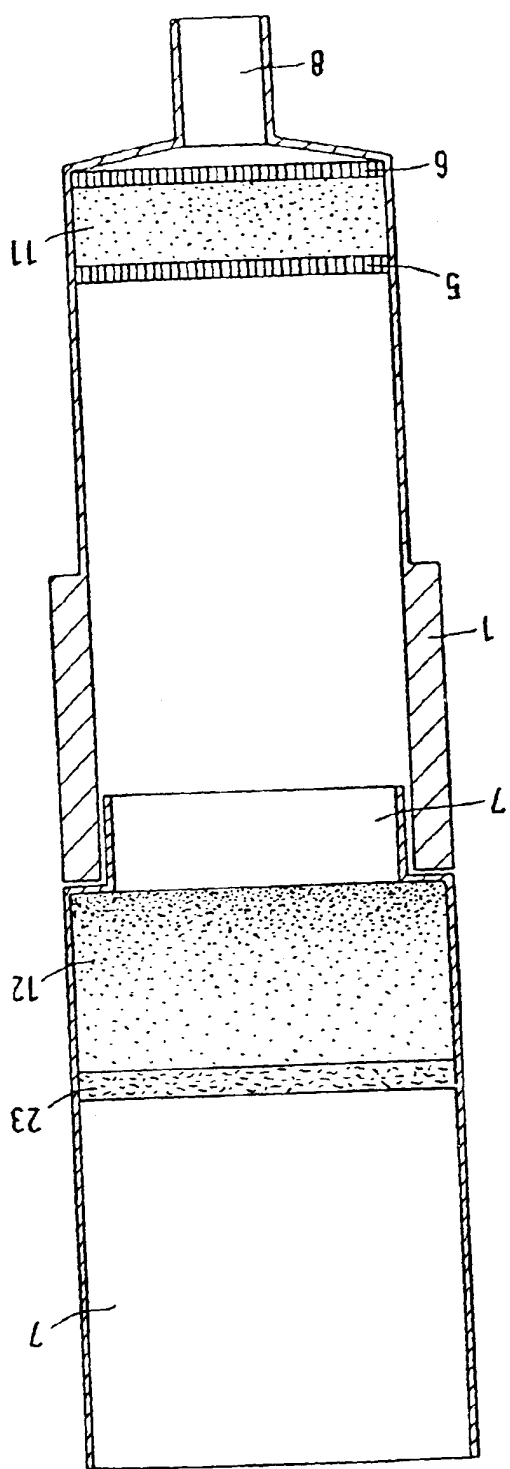


FIG. 10

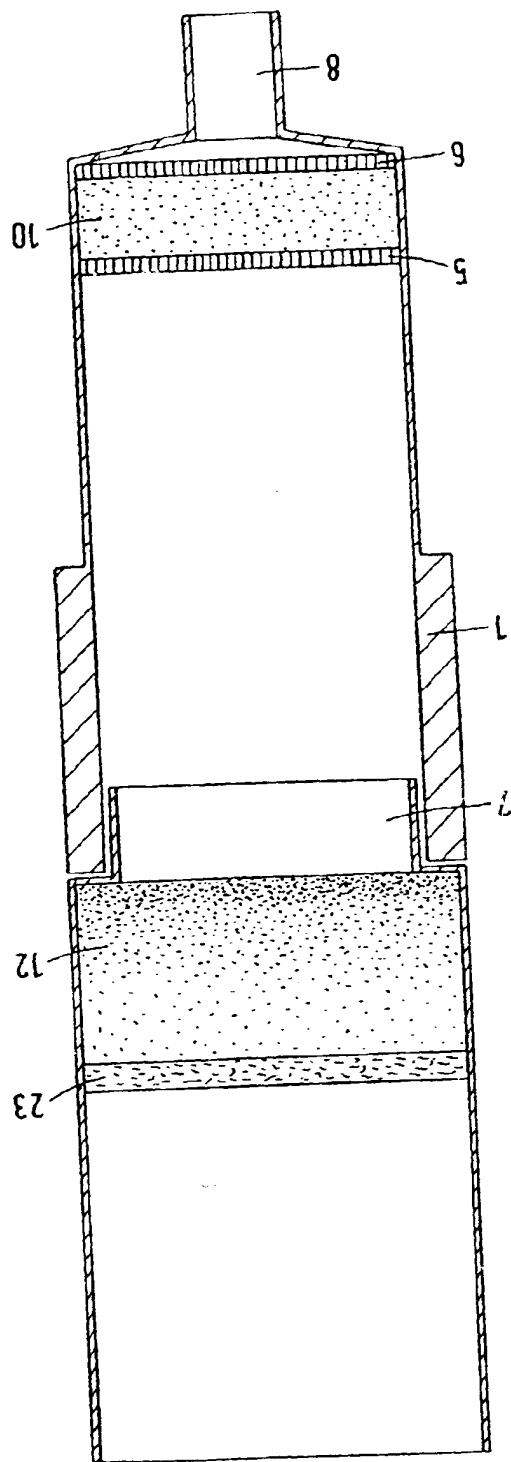


FIG. 9

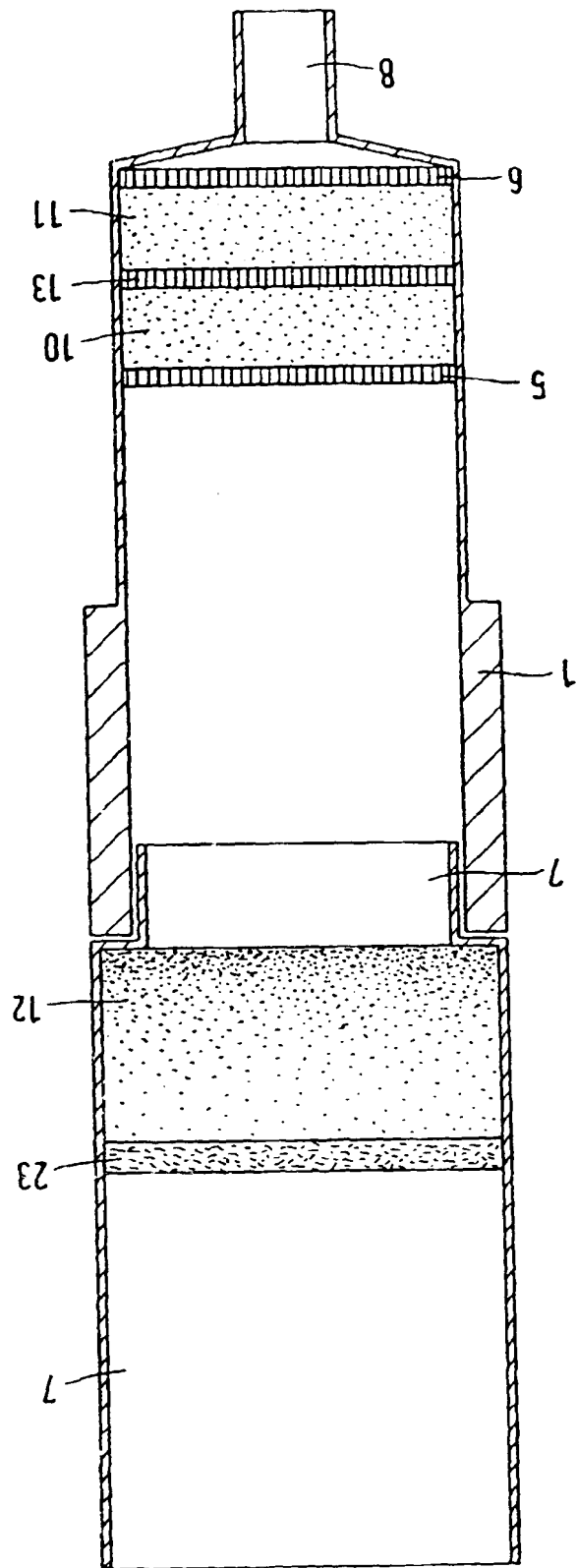
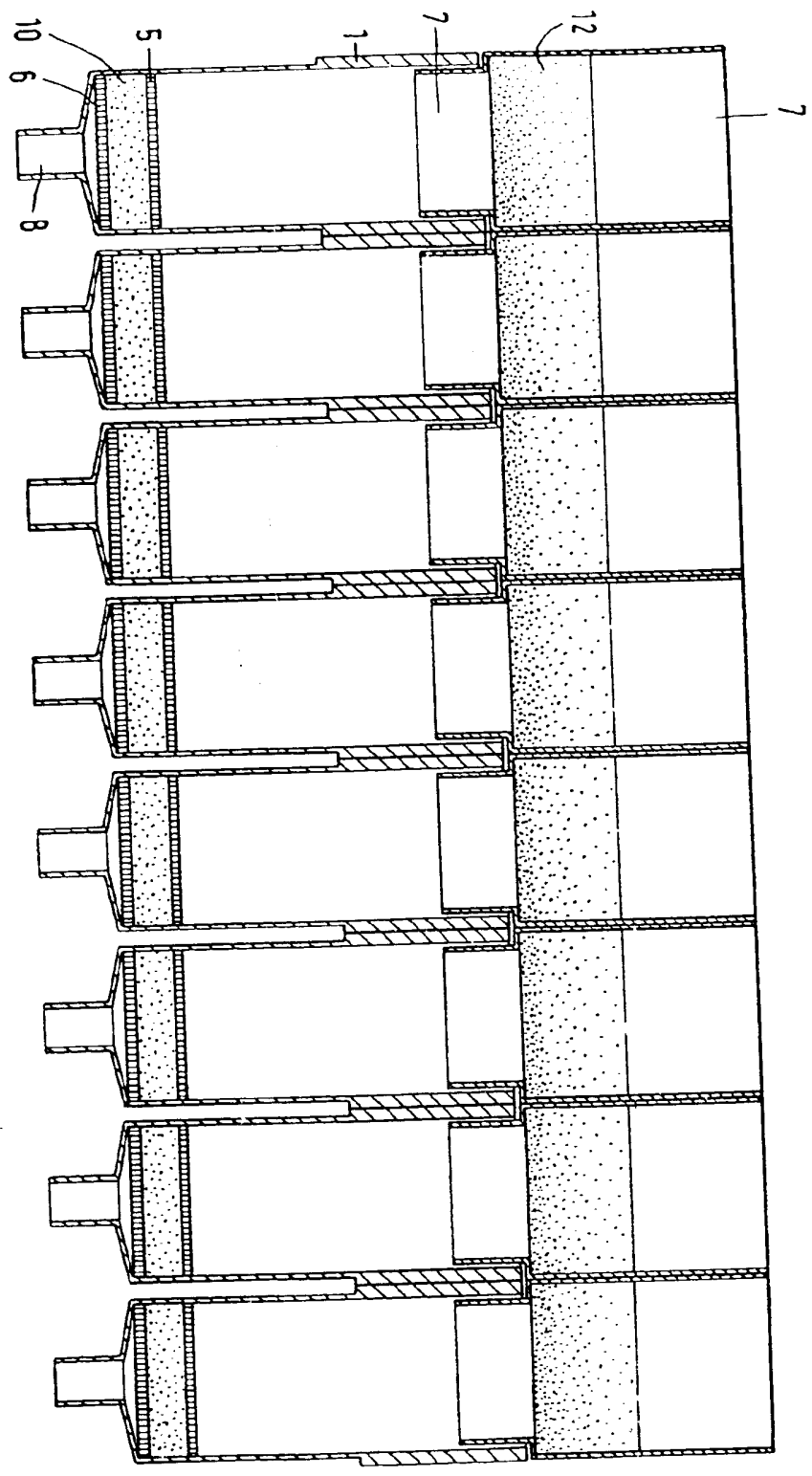


FIG. 11



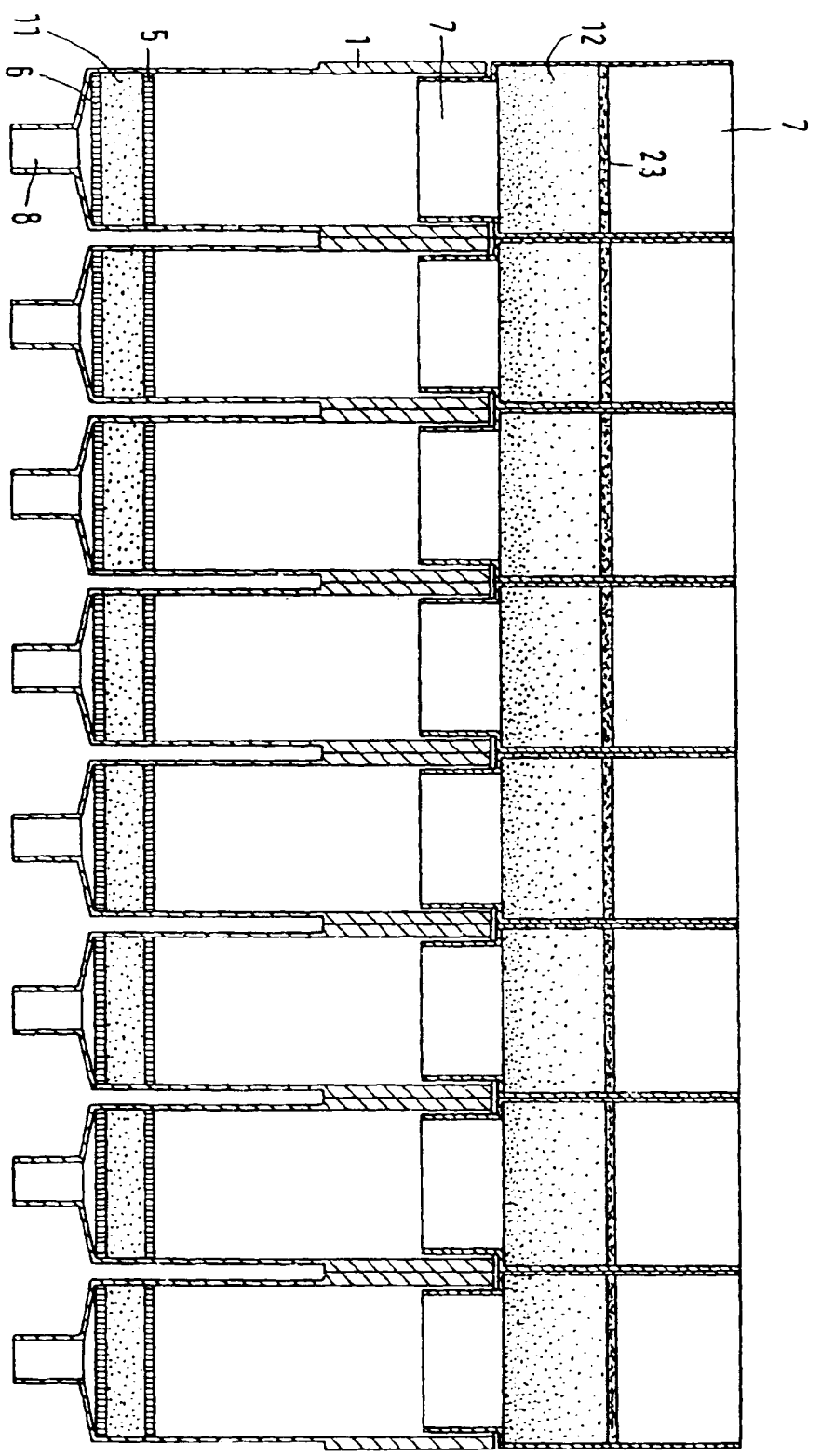


FIG.13

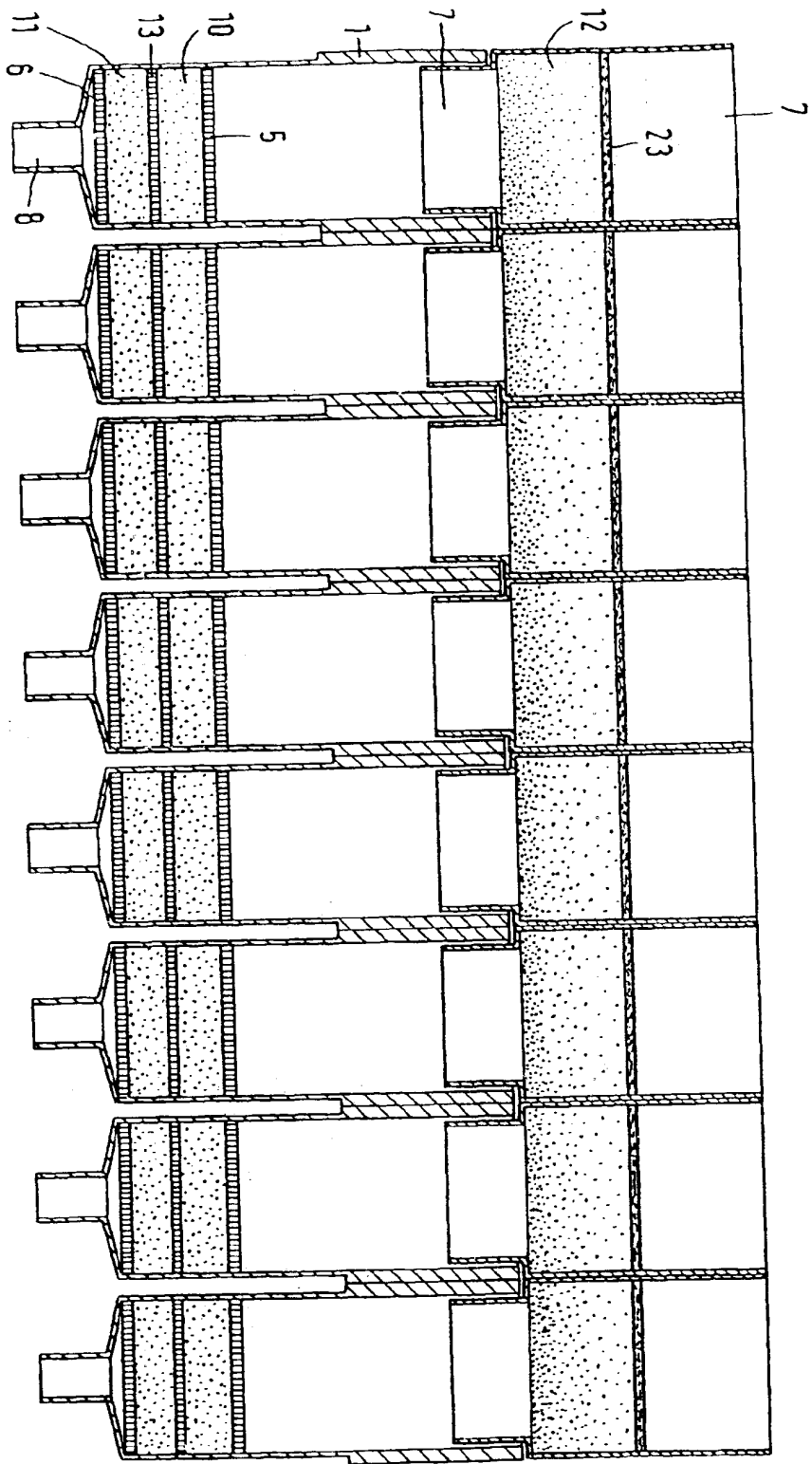
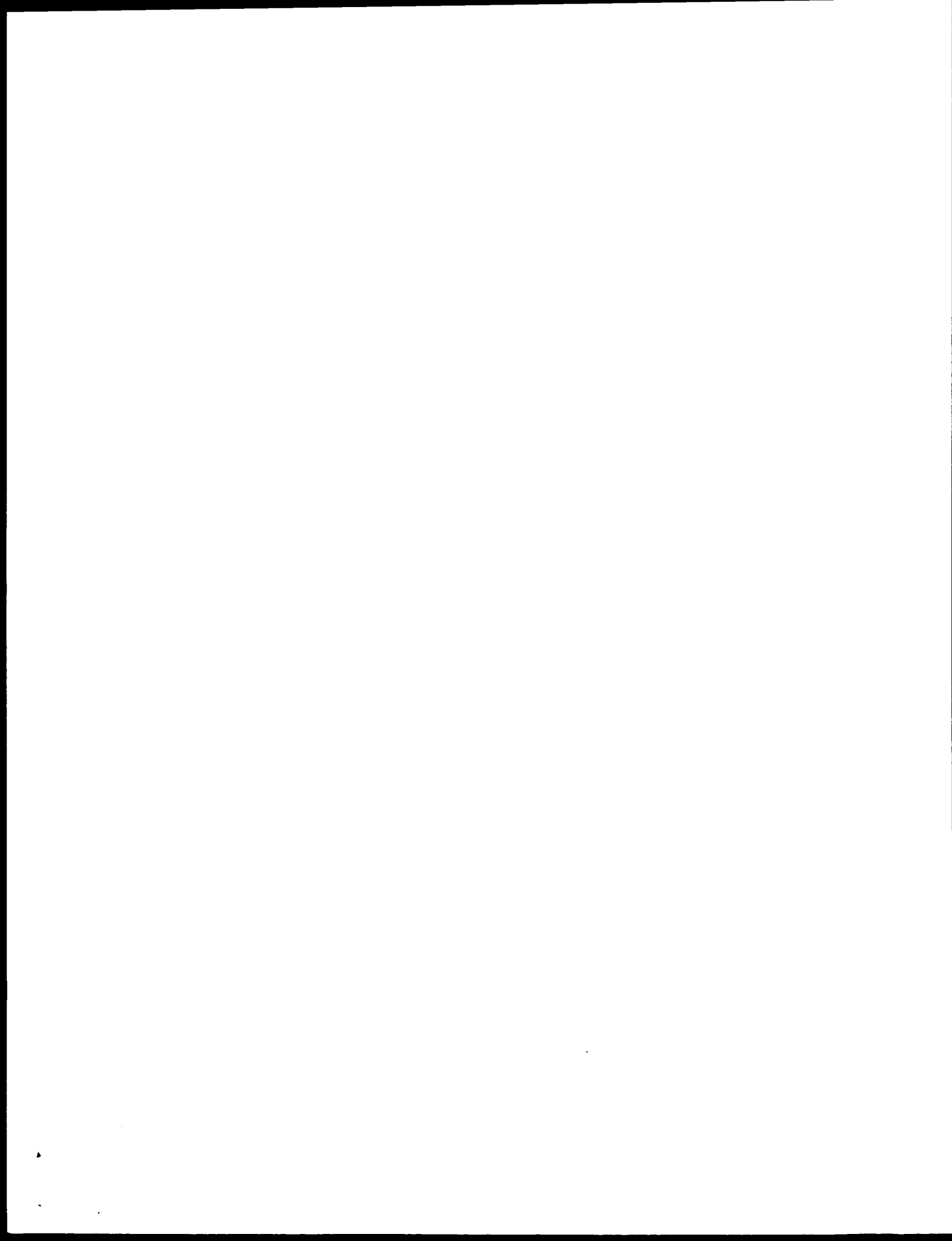


FIG. 14





(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

EP 0 875 271 A3

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(12)

(88) Veröffentlichungstag A3: 25.04.2001 Patentblatt 2001/17

(43) Veröffentlichungstag A2: 04.11.1998 Patentblatt 1998/45

(21) Anmeldenummer: 98107576.5

(22) Anmeldetag: 01.12.1992

(84) Benannte Vertragsstaaten: BE CH DE DK FR GB IT LI LU NL SE

(30) Priorität: 02.12.1991 DE 4139664

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en) nach Art. 76 EPÜ: 92924637.9 / 0 616 639

(71) Anmelder: QIAGEN GmbH
40724 Hilden (DE)

(72) Erfinder: Colpan, Melin, Dr.
45219 Essen (DE)

(74) Vertreter:
Meyers, Hans-Wilhelm, Dr.Dipl.-Chem. et al
Patentanwälte
von Kreisler-Setling-Werner
Postfach 10 22 41
50462 Köln (DE)

(54) Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

(57) Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt werden durch Filtration an einer Filterschicht.

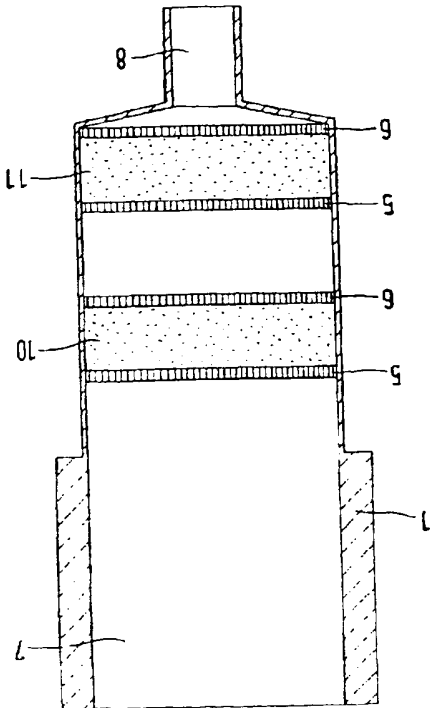


FIG. 1



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		Kategorie		Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile		Betrieb	Klassifikation der Anmeldung (Incl.7)
P, X	WO 92 00132 A (COULTER CORP.) 9. Januar 1992 (1992-01-09) * Ansprüche 1-15 *	1		B01D39/00 C12M1/12 C12N1/08 C12N15/10 C12Q1/68			
X	WO 87 07645 A (LONDON HOSPITAL MED COLL) 17. Dezember 1987 (1987-12-17) * Anspruch 1 *	1			2-6		
X	EP 0 389 063 A (AKZO NV) 26. September 1990 (1990-09-26) * Ansprüche 1-13 *	1, 2, 5					
A	US 4 923 978 A (MCCORMICK RANDY M) 8. Mai 1990 (1990-05-08) * Ansprüche 1-4 *	1-6					
A	MARKO M A ET AL: "A PROCEDURE FOR THE LARGE-SCALE ISOLATION OF HIGHLY PURIFIED PLASMID DNA USING ALKALINE EXTRACTION AND BINDING TO GLASS POWDER" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, US, ORLANDO, FL, Bd. 121, Nr. 2, 1. April 1982 (1982-04-01), Seiten 382-387, XP000602405 ISSN: 0003-2697 * das ganze Dokument *	1-6					
A	US 5 057 426 A (HENCO KARSTEN ET AL) 15. Oktober 1991 (1991-10-15) * das ganze Dokument *	1-6					
A	DE 37 17 209 A (DIAGEN INST MOLEKULARBIO) 1. Dezember 1988 (1988-12-01) * Ansprüche 1-4 *	1-6					
Der vorliegende Recherchebericht wurde für alle Patentansprüche erstellt							
Fächerbezeichnung		Abschlusstermin der Patentanmeldung		Fächer			
DEN HAAG		1. März 2001		Osborne, H			
KATEGORIE DER GEMANNNTEN DOKUMENTE X von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie Y von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A technischer Hintergrund P Zwischenliteratur T der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E, älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D in der Anmeldung angeführtes Dokument L aus anderen Gründen angeführtes Dokument A Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument							

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 98 10 7576

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patente über die Familienmitglieder entsprechend dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am 01-03-2001

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9200132 A	09-01-1992	US 5076933 A AT 160294 T AU 654669 B AU 8215091 A CA 2084873 A DE 69128249 D DE 69128249 T EP 0536297 A JP 6507375 T US 5221483 A	31-12-1991 15-12-1997 17-11-1994 23-01-1992 30-12-1991 02-01-1998 25-06-1998 14-04-1993 25-08-1994 22-06-1993
WO 8707645 A	17-12-1987	EP 0268647 A JP 1500482 T	01-06-1988 23-02-1989
EP 0389063 A	26-09-1990	NL 8900725 A AT 156830 T AU 641641 B AU 5215390 A CA 2012777 A DE 69031237 D DE 69031237 T DE 389063 T DE 389063 T DK 389063 T EP 0819696 A ES 2085245 T GR 96300019 T GR 3025351 T JP 2289596 A JP 2680462 B JP 10072485 A KR 148693 B US 5234809 A ZA 9002190 A	16-10-1990 15-08-1997 30-09-1993 27-09-1990 23-09-1990 18-09-1997 02-01-1998 10-10-1996 30-03-1996 21-01-1998 01-06-1996 31-03-1996 27-02-1998 29-11-1990 19-11-1997 17-03-1998 01-08-1998 10-08-1993 24-12-1991
US 4923978 A	08-05-1990	AU 625639 B AU 3352589 A AU 632284 B WO 9010637 A	16-07-1992 09-10-1990 24-12-1992 20-09-1990
US 5057426 A	15-10-1991	DE 3639949 A AT 94553 T CA 1339772 A DE 3787445 D DE 3787445 T EP 0268946 A JP 7013077 B	09-06-1988 15-10-1993 24-03-1998 21-10-1993 07-07-1994 01-06-1988 15-02-1995

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang: siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 98 10 7576

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfüllen keine Gewähr.

01-03-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(ern) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5057426 A	JP 63150294 A	22-06-1988	
DE 3717209 A	01-12-1988	KEINE	

EPO FORM P041

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82